

- <sup>22</sup> M. E. JONES, S. BLACK, R. M. FLYNN ET F. LIPMANN, *Biochim. Biophys. Acta*, 12 (1953) 141.  
<sup>23</sup> W. W. WESTERFELD, *J. Biol. Chem.*, 101 (1945) 495.  
<sup>24</sup> HAGER ET I. C. GUNSAULUS, cités par S. KORKES, dans *Methods in Enzymology*, Vol. I, Academic Press, Inc., New York, 1955, p. 490.  
<sup>25</sup> I. C. GUNSAULUS, *The Mechanism of Enzyme Action*, édité par W. D. McELROY ET B. GLASS, The Johns Hopkins Press, 1954, p. 545.  
<sup>26</sup> E. JUNI, *J. Biol. Chem.*, 195 (1952) 727.  
<sup>27</sup> R. A. PETERS, L. A. STOCKEN, ET R. H. S. THOMPSON, *Nature*, 156 (1945) 616.  
<sup>28</sup> R. A. PETERS, H. M. SINCLAIR ET R. H. S. THOMPSON, *Biochem. J.*, 40 (1946) 516.  
<sup>29</sup> P. M. NOSSAL, *Biochem. J.*, 57 (1954) 62.  
<sup>30</sup> P. P. SLONIMSKI, *Conférences et Rapports du 3eme Congrès International de Biochimie, Bruxelles, 1955*, Vaillant-Carmanne, Liège, 1956, p. 242.  
<sup>31</sup> M. H. HIRSCH, *Biochim. Biophys. Acta*, 9 (1952) 674.  
<sup>32</sup> J. M. WIAME, *Advances in Enzymol.*, 18 (1957) 241.  
<sup>33</sup> D. T. O. WONG ET S. AJL, *J. Am. Chem. Soc.*, 78 (1956) 3230.  
<sup>34</sup> H. L. KORNBERG ET H. A. KREBS, *Nature*, 179 (1957) 988.  
<sup>35</sup> B. EPHRUSI, H. HOTTINGER ET A. M. CHIMENES, *Ann. Inst. Pasteur*, 76 (1949) 351.  
<sup>36</sup> E. VANDERWINKEL, S. BOURGEOIS ET J. M. WIAME, *Arch. int. physiol. biochim.*, 66 (1958) 129.  
<sup>37</sup> H. HOLZER ET H. W. GOEDDE, *Biochem. Z.*, 329 (1957) 175.

Reçu le 7 novembre 1957

## INFLUENCE COMPARÉE DU CHLORURE DE SODIUM ET DU TWEEN 80 SUR L'ACTIVITÉ ENZYMATIQUE DE LA CARBOXYPEPTIDASE A DU PANCRÉAS

JULIE LABOUESSE

*Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences (Paris)*

Diverses investigations<sup>1-4</sup> concernant l'influence de la force ionique sur l'activité enzymatique de la carboxypeptidase A du pancréas ont montré que l'activité de cet enzyme croît avec la force ionique du milieu, jusqu'à ce que celle-ci atteigne une valeur de 0.5, et ce, quel que soit le sel présent: à partir de cette valeur, il n'y a plus de modification de l'action enzymatique. D'autre part, il a été constaté<sup>2</sup> que les sels pouvaient être remplacés par le Tween 80\*, substance tensioactive constituée par un dérivé polyoxyalkylénique d'un ester monoooléique du sorbitane. Dans ce cas, comme d'ailleurs dans le cas des électrolytes, l'effet activateur est d'autant plus marqué que l'enzyme est plus dilué: on a vu en effet que, lorsque les concentrations de la carboxypeptidase sont de l'ordre de quelques dixièmes de  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , la vitesse de la réaction enzymatique en absence de sel et de Tween 80 n'est pas proportionnelle à la quantité d'enzyme présent; l'addition au mélange réactionnel, soit de chlorure de sodium 0.5 M, soit de 0.05 % de Tween 80 rétablit la proportionnalité tout en accroissant la vitesse d'hydrolyse du substrat<sup>2</sup>. Il est à remarquer à ce sujet que ni les sels, ni le Tween 80 n'inhibent la dénaturation thermique de l'enzyme en solution diluée, alors que le Tween 80, mais non les sels, protège l'enzyme contre la dénaturation de surface<sup>5</sup>.

Il était donc intéressant de comparer les constantes cinétiques et thermodynamiques liées à l'hydrolyse d'un substrat convenable, en présence des substances

\* Atlas Powder Company, Wilmington, Delaware, États-Unis.

*Bibliographie p. 350.*

activatrices en question; on pouvait ainsi espérer connaître le mécanisme de leur effet. Le présent travail concernant plus particulièrement l'hydrolyse de la carbobenzoxyglycyl-L-phénylalanine, est ainsi consacré d'une part à la mesure, à différentes températures, des constantes de vitesse et des constantes de Michaelis, ainsi qu'à la détermination des énergies d'activation  $E$ , des variations d'enthalpie  $\Delta H^*$ , d'énergie libre  $\Delta F^*$  et d'entropie  $\Delta S^*$  liées à l'activation du complexe enzyme-substrat; et d'autre part à l'étude de l'action sur la carboxypeptidase de substances tensioactives autres que le Tween 80.

### PARTIE EXPÉRIMENTALE

#### *Carboxypeptidase\**

Les cristaux de carboxypeptidase sont lavés par centrifugation dans l'eau à  $4^\circ$ , puis suspendus dans une solution de chlorure de sodium  $M$ , tamponnée à pH 7.5 par du véronal sodique  $M/50$  et de l'acide chlorhydrique. La suspension est dialysée avec agitation contre la même solution saline tamponnée. Au bout de 48 h, le contenu du sac de dialyse est centrifugé: le liquide surnageant constitue la *solution mère* d'enzyme, contenant de l'ordre de 1 mg de protéine par ml. Maintenue à la glacière, cette solution conserve son activité inchangée pendant plus d'un mois. La teneur en protéine des solutions est déterminée à l'aide d'un spectrophotomètre Beckman, par mesure de l'absorption à  $278 \text{ m}\mu$ , sur des solutions contenant de l'ordre de 0.1 mg de carboxypeptidase par ml. Les valeurs de 15.1% pour la teneur en azote de l'enzyme<sup>6</sup> et de 34,000 pour le poids moléculaire<sup>7</sup> ont été adoptées pour déterminer le coefficient d'extinction de la carboxypeptidase à  $278 \text{ m}\mu$ : ce coefficient est égal à  $E_{1\text{cm}}^{1\text{mg/ml}} = 1.93$ , à pH 7.5, en solution tampon de véronal sodique  $M/500$ . Toutes les dilutions d'enzyme ainsi que toutes les expériences sont réalisées en milieu tampon véronal sodique HCl  $M/50$ , pH 7.5.

#### *Carbobenzoxyglycyl-L-phénylalanine*

Ce substrat est obtenu par carbobenzoxylation directe de la glycyl-L-phénylalanine. Cette dernière est préparée suivant FISCHER ET SCHOELLER<sup>8</sup>. Après recristallisations dans l'alcool éthylique à 50%, la carbobenzoxyglycyl-L-phénylalanine obtenu fond à  $124\text{--}125^\circ$  et présente un pouvoir rotatoire ( $a_D^{20} = +39^\circ$  ( $c = 5\%$  dans alcool éthylique), (littérature<sup>9</sup>: p.f.  $125^\circ\text{--}126^\circ$ ; ( $a_D = +38^\circ 5$ ).

#### *Carbobenzoxyglycyl-L-leucine*

Comme dans le cas précédent, ce substrat est préparé par carbobenzoxylation directe de la glycyl-L-leucine. La synthèse de ce peptide est faite selon FISCHER ET WARBURG<sup>10</sup>. Après recristallisations dans un mélange d'éther de pétrole et d'acétate d'éthyle, la carbobenzoxyglycyl-L-leucine fond à  $103^\circ$  et présente un pouvoir rotatoire ( $a_D^{20} = -10^\circ 3$  ( $c = 5\%$  dans alcool éthylique) (littérature: p.f.  $103^\circ$ , p.f.  $141^\circ\text{--}142^\circ$ ; ( $a_D^{20} = -10^\circ 3$  ( $c = 5\%$  dans alcool éthylique)<sup>1, 11</sup>).

#### *Hippuryl-DL-phénylalanine*

La synthèse de cette substance est effectuée suivant CURTIUS<sup>12</sup> par couplage de l'hippurazide avec le sel de sodium de la DL-phénylalanine. L'hippurazide est lui-même préparé à partir de l'hippuryl-éthylester. Après recristallisations dans l'alcool à 50%, l'hippuryl-DL-phénylalanine obtenue fond à  $170^\circ\text{--}171^\circ$  (littérature<sup>12</sup>: p.f.  $172^\circ$ ).

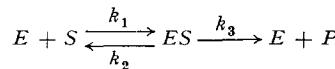
#### *Dosage de l'activité carboxypeptidase*

Le substrat utilisé pour ce dosage est l'hippuryl-DL-phénylalanine. Les mesures sont faites à  $25^\circ \pm 0^\circ 05$ . Le milieu réactionnel est constitué par 3 ml d'une solution de véronal  $M/50$ , pH 7.5 contenant le peptide à la concentration de  $4 \cdot 10^{-2} M$ , une quantité donnée d'enzyme et 0.05% de Tween 80. La vitesse d'hydrolyse est déterminée par le dosage photométrique<sup>13</sup>, sur des prises de 0.5 ml, de la L-phénylalanine libérée en fonction du temps. La densité optique ( $D$ ) des solutions est mesurée à  $570 \text{ m}\mu$  au moyen d'un spectrophotomètre Coleman, type Junior, dans des tubes cylindriques de 1 cm de diamètre. Les vitesses d'hydrolyse sont exprimées arbitrairement en variation de la densité optique à  $570 \text{ m}\mu$ , par minute, multipliée par  $10^3$  ( $AD/\text{min} \cdot 10^3$ ). L'unité d'activité carboxypeptidasique (U.C.) est définie comme l'activité qui donne une variation de densité optique de  $10^{-3}/\text{min}$  dans les conditions décrites; c'est donc l'activité correspondant à une vitesse d'hydrolyse de 1.

\* Worthington Biochemical Corporation, Freehold (N.J.) États-Unis.

*Déterminations des constantes cinétiques*

On utilise ici les notations habituelles:



*E* étant l'enzyme libre, *S* le substrat libre, *ES* le complexe enzyme-substrat et *P* les produits d'hydrolyse.  $k_1$  et  $k_2$  sont respectivement les constantes de vitesse de formation et de vitesse de dissociation du complexe *ES*,  $k_3$  la constante de vitesse de décomposition du complexe *ES* en enzyme libre et en produits d'hydrolyse; cette décomposition peut être considérée comme irréversible.

La détermination expérimentale de la constante de Michaelis  $K_M = k_2 + k_3/k_1$  et de la vitesse maximum  $V_m$  est faite par la méthode graphique de EADIE<sup>14</sup>, méthode qui représente la vitesse de la réaction enzymatique *v* sous la forme:

$v = V_m - K_M v/s$ , avec  $V_m = k_3 e$ , où *s* = concentration en substrat libre et *e* = concentration en enzyme actif.

Les concentrations des substrats sont ici telles qu'elles encadrent la valeur de la constante de Michaelis et que les deux concentrations extrêmes soient dans un rapport de 1 à 10. Ces concentrations sont d'autre part établies de sorte que soit évité tout phénomène d'inhibition par excès du substrat<sup>1</sup>. Les expériences sont faites en présence soit de chlorure de sodium 0.5 M, soit de Tween 80 à la concentration de 0.05% (Cf. Fig. 1).

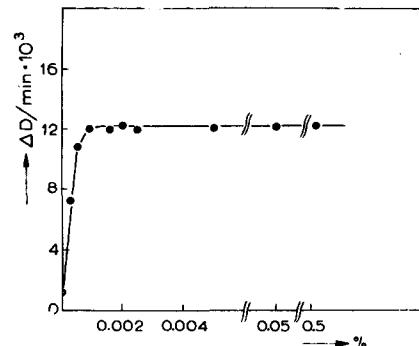


Fig. 1. Influence de la concentration du Tween 80 sur la vitesse d'hydrolyse de l'hippuryl-DL-phénylalanine par la carboxypeptidase. Abscisses: Concentration du Tween 80 dans le mélange réactionnel, exprimée en % (poids par volume). Ordonnées: Vitesse d'hydrolyse. Conditions d'hydrolyse: solution tampon véronal M/50, pH 7.5; hippuryl-DL-phénylalanine  $4 \cdot 10^{-2}$  M; Carboxypeptidase: 0.06 µg/ml; température: 25°.

Les mesures sont effectuées en solution tampon de véronal sodique HCl M/50 à pH 7.5 et à plusieurs températures, définies à  $\pm 0.05$  près, comprises entre 25° et 37°. Les vitesses d'hydrolyse, mesurées comme il a été dit dans le paragraphe précédent sont exprimées en variation de la densité optique à 570 m $\mu$ /min, multipliées par 10<sup>3</sup>. La libération de 0.02 µmol/ml/min, de L-phénylalanine par hydrolyse de la carbobenzoxyglycyl-L-phénylalanine correspond ici à une vitesse de 21; celle de la même quantité, dans les mêmes conditions, de L-leucine par hydrolyse de la carbobenzoxyglycyl-L-leucine, à une vitesse de 22.

On fait deux expériences à chaque température, avec des concentrations différentes en enzyme; pour obtenir des vitesses d'hydrolyse mesurables dans les conditions expérimentales choisies, la *solution mère* de carboxypeptidase est diluée de 5,000 à 10,000 fois selon la température de l'expérience. Dans le cas des mesures en présence de Tween 80, où la substance tensioactive est présente aussi bien dans la solution tampon diluante que dans les solutions de substrat, on peut admettre qu'il ne se produit pas d'inactivation par dilution. On calcule donc la concentration en enzyme actif à partir de la concentration en protéine de la *solution mère* (mesure de l'absorption à 280 m $\mu$ ). Par contre, dans le cas des mesures en présence de chlorure de sodium, où les dilutions de la *solution mère* ne peuvent être faites en présence de Tween 80, il se produit pendant la dilution une inactivation partielle de l'enzyme<sup>5</sup>. Cette inactivation étant variable d'une expérience à l'autre, il est indispensable de mesurer chaque fois, dans les conditions définies plus haut, l'activité carboxypeptidase de la solution diluée. On considère ensuite que la concentration pondérale d'enzyme actif est proportionnelle à l'activité mesurée. Malheureusement cette façon d'opérer introduit une certaine imprécision dans le calcul des constantes de vitesse en présence de chlorure de sodium.

*Déterminations des constantes thermodynamiques*

Ces déterminations sont faites ici seulement pour l'hydrolyse de la carbobenzoxyglycyl-L-phénylalanine. On détermine l'énergie d'activation *E* de la réaction de décomposition du complexe

enzyme-substrat par l'équation d'Arrhenius:  $\log k_3 = -E/2.3 RT + C$ ; on calcule les variations d'enthalpie  $\Delta H^*$  d'énergie libre  $\Delta F^*$  et d'entropie  $\Delta S^*$  au moyen des équations thermodynamiques habituelles<sup>15,16</sup>.

*Étude de l'action de quelques substances tensioactives autres que le Tween 80*

Quelques expériences ont été consacrées à l'étude de l'influence de substances tensioactives dont la nature et la concentration sont données dans le Tableau IV.

RÉSULTATS

*A. Détermination des constantes cinétiques et thermodynamiques*

*Hydrolyse de la carbobenzoxylglycyl-L-phénylalanine en présence de 0.05 % de Tween 80.* Le détail et les résultats des mesures de vitesse de l'hydrolyse à cinq températures et à différentes concentrations en substrat sont donnés dans la Fig. 2. Les droites représentant les variations de  $v/e$  en fonction de  $v/es$  aux cinq températures considérées sont sensiblement parallèles; la pente des droites étant ici égale à la constante de Michaelis en valeur absolue, il en résulte que cette dernière ne varie sensiblement pas avec la température. L'indépendance de  $K_M$  de la température avait déjà été constatée par LUMRY ET SMITH<sup>1</sup> pour l'hydrolyse de la carbobenzoxylglycyl-L-phénylalanine, en présence de chlorure de potassium 0.5 M entre 5° et 25°. La valeur

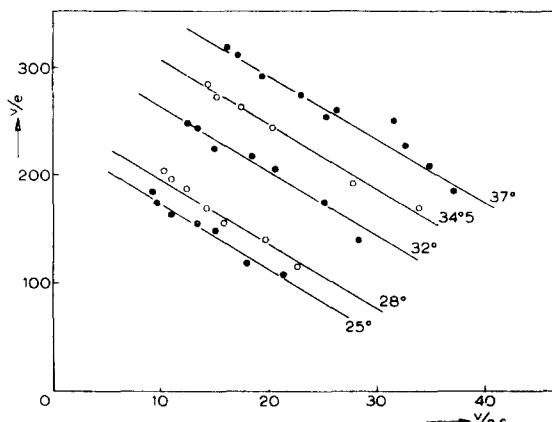


Fig. 2. Détermination des constantes de Michaelis entre 25° et 37° en présence de 0.05 % de Tween 80. Abscisses:  $v/es$ ,  $v$  exprimé en  $1D/\text{min} \cdot 10^3$ ;  $e$  exprimé en  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ;  $s$  exprimé en  $\text{mmoléqures}/\text{l}$ . Ordonnées:  $v/e$ ,  $v$  vitesse rapportée à 1  $\mu\text{g}$  d'enzyme par ml du mélange réactionnel. Conditions d'hydrolyse: solution tampon véronal pH 7.5; carbobenzoxylglycyl-L-phénylalanine; carboxypeptidase:  $e$  variable, 0.08  $\mu\text{g}/\text{ml}$  à 0.2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de mélange réactionnel.

TABLEAU I

HYDROLYSE DE LA CARBOBENZOXYGLYCYL-L-PHÉNYLALANINE EN PRÉSENCE DE 0.05 % DE TWEEN 80

Température °C	$K_M$ (molécule/litre)	$V_m/e$ ( $1D \text{ min} \cdot 10^3$ par $\mu\text{g}$ d'enzyme par ml)	$k_3$ (sec. <sup>-1</sup> )
25	$6.1 \cdot 10^{-3}$	241	126
28	$6.3 \cdot 10^{-3}$	262	139
32	$6.1 \cdot 10^{-3}$	326	173
34.5	$6.0 \cdot 10^{-3}$	368	196
37	$5.8 \cdot 10^{-3}$	412	219

de  $K_M$  aux diverses températures, déterminée à partir de la Fig. 2, est donnée dans le Tableau I. Il apparaît ainsi que la constante de Michaelis pour l'hydrolyse de la carbobenzoxyglycyl-L-phénylalanine entre 25° et 37°, en présence de 0.05 % de Tween est de  $6 \cdot 10^{-3}$  mol./l.

Le même tableau indique les valeurs de vitesses maxima rapportées à 1  $\mu\text{g}$  d'enzyme/ml déduites des ordonnées à l'origine des droites de la Fig. 2, ainsi que les valeurs des constantes de vitesse  $k_3$  calculées d'après la relation  $V_m = k_3 e$ ,  $e$  étant exprimé dans ce calcul en mol./l et  $V_m$  en mol. de substrat hydrolysé par 1 et par sec  $k_3$  est ainsi exprimé en  $\text{sec}^{-1}$ .

La Fig. 3 représente la variation de  $\log k_3$  en fonction de l'inverse de la température absolue, variation qui suit ici la loi d'Arrhenius. La pente de la droite obtenue permet de déterminer l'énergie d'activation  $E$  caractérisant l'activation du complexe enzyme-substrat et permettant sa décomposition. La valeur de  $E$  ainsi que les valeurs

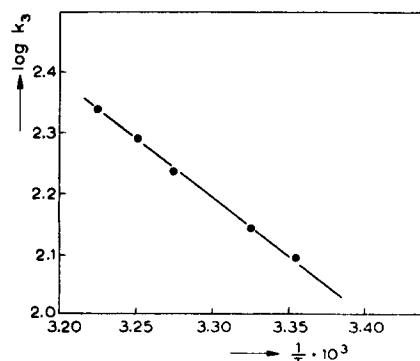


Fig. 3. Énergie d'activation de la réaction d'hydrolyse de la carbobenzoxyglycyl-L-phénylalanine par la carboxypeptidase en présence de 0.05 % de Tween 80. Abscisses: inverse de la température absolue. Ordonnées: logarithme décimal de la constante de vitesse  $k_3$ .

à 25° de  $\Delta H^*$ ,  $\Delta F^*$  et  $\Delta S^*$  que l'on déduit des valeurs de  $E$  et de  $k_3$  à 25° sont présentées dans le Tableau II. Ces valeurs sont bien caractéristiques de l'hydrolyse enzymatique d'une liaison peptidique<sup>7</sup>.

*Hydrolyse de la carbobenzoxyglycyl-L-phénylalanine en présence de chlorure de sodium 0.5 M.* Le détail et les résultats des mesures de vitesse de l'hydrolyse, à cinq températures et à différentes concentrations en substrat, sont donnés dans la Fig. 4. Comme dans le cas précédent, les droites obtenues aux différentes températures sont sensiblement parallèles; la constante de Michaelis en présence de chlorure de sodium est donc encore ici pratiquement indépendante de la température entre 25° et 37°. Les chiffres du Tableau III montrent que la constante de Michaelis pour l'hydrolyse de la carbobenzoxyglycyl-L-phénylalanine, entre 25° et 37°, en présence de chlorure de sodium 0.5 M est de  $1.8 \cdot 10^{-2}$  mol./l.

Le Tableau III donne également les valeurs de  $V_m/e$  et les valeurs de  $k_3$  en fonction de la température. La variation de  $\log k_3$  en fonction de l'inverse de la température absolue est illustrée par la Fig. 5: on tire de la pente de la droite obtenue une valeur de 8,100 cal./mol. pour l'énergie d'activation  $E$  de l'hydrolyse en question en présence de chlorure de sodium 0.5 M. Les valeurs des autres constantes thermodynamiques calculées à 25° sont indiquées dans le Tableau II.

TABLEAU II  
CONSTANTES CINÉTIQUES ET THERMODYNAMIQUES LIÉES A L'HYDROLYSE DE  
QUELQUES SUBSTRATS DE LA CARBOXYPEPTIDASE

$$\Delta H^* = E - RT; \Delta F^* = -2.3 RT \log \frac{k}{RT/Nh}; \Delta S^* = \frac{\Delta H^* - \Delta F^*}{T}$$

Constantes	Hydrolyse en présence de	
	Tween 80 0.05 %	Chlorure de sodium 0.5 M
<i>Carbobenzoxyglycyl-L-phénylalanine</i>		
$k_3$ à 25° (sec <sup>-1</sup> )	126	218
$k_3$ à 37° (sec <sup>-1</sup> )	219	390
$K_M$ entre 25° et 37° (mol./l.)	0.6 · 10 <sup>-2</sup>	1.8 · 10 <sup>-2</sup>
$E$ entre 25° et 37° (cal./mol.)	8,600	8,700
$\Delta H^*$ à 25° (cal./mol.)	8,000	8,100
$\Delta F^*$ à 25° (cal./mol.)	14,600	14,300
$\Delta S^*$ à 25° (cal./mol./degré)	— 22	— 21
<i>Carbobenzoxyglycyl-L-leucine</i>		
$k_3$ à 37° (sec <sup>-1</sup> )	23	24
$K_M$ à 37° (mol./l.)	2.2 · 10 <sup>-3</sup>	6.3 · 10 <sup>-3</sup>
<i>Hippuryl-DL-phénylalanine</i> §		
$k_3$ à 37° (sec <sup>-1</sup> )	185	201
$K_M$ à 37° (mol./l.)	0.8 · 10 <sup>-3</sup>	2.2 · 10 <sup>-3</sup>

§ Valeurs de  $K_M$  calculées pour le dérivé L.

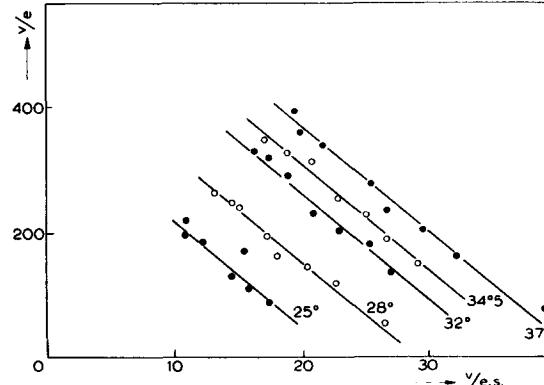


Fig. 4. Détermination des constantes de Michaelis entre 25° et 37° en présence de chlorure de sodium 0.5 M. Mêmes légendes que la Fig. 2.

TABLEAU III  
HYDROLYSE DE LA CARBOZOXYGLYCYL-L-PHÉNYLALANINE EN PRÉSENCE  
DE CHLORURE DE SODIUM 0.5 M

Température °C	$K_M$ (molécule/litre)	$V_{m'e}$ ( $\Delta D$ /min · 10 <sup>3</sup> par $\mu$ g d'enzyme par ml)	$k_3$ (sec <sup>-1</sup> )
25	1.85 · 10 <sup>-2</sup>	402	218
28	1.7 · 10 <sup>-2</sup>	450	266
32	1.75 · 10 <sup>-2</sup>	585	322
34.5	1.75 · 10 <sup>-2</sup>	656	357
37	1.75 · 10 <sup>-2</sup>	718	390

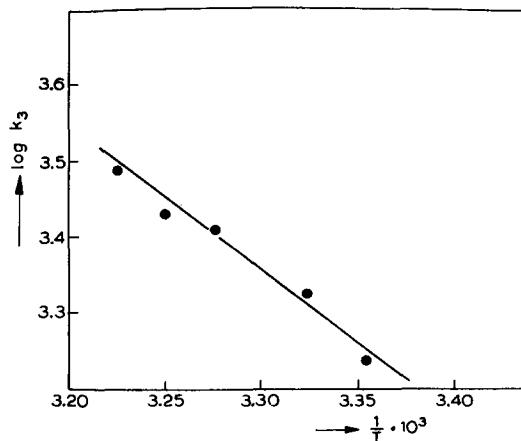


Fig. 5. Energie d'activation de la réaction d'hydrolyse de la carbobenzoxyglycyl-L-phénylalanine par la carboxypeptidase en présence de chlorure de sodium 0,5 M. Mêmes légendes que la Fig. 3.

TABLEAU IV  
INFLUENCE DE QUELQUES SUBSTANCES TENSIOACTIVES SUR L'ACTIVITÉ  
DE LA CARBOXYPEPTIDASE

Tween 80: Dérivé polyoxyalkylénique d'un ester monooléique du sorbitane. Tween 20: dérivé polyoxyalkylénique d'un ester monolaurique du sorbitane. Brij 35: dérivé polyméthylénique de l'alcool laurique. Zéphirol 50: chlorure d'alkyldiméthylbenzylammonium. Cétavlon: bromure de cétyltriméthylammonium, P.M. = 364. Br. de L: bromure de lauryldiméthylbenzylammonium, P.M. = 384. DSNa: dodécylsulfate de sodium, P.M. = 288. EDSNa: éthoxydodécylsulfate de sodium, P.M. = 332. TCNa: taurocholate de sodium, P.M.: 533. Saponine (Merck).

Conditions d'hydrolyse	Vitesse d'hydrolyse (ΔD/min. · 10 <sup>3</sup> )
Sans addition	1
NaCl 0,5 M	22
<i>Substances tensioactives non-ioniques</i>	
Tween 80, 0,05 %	23
Tween 20, 0,05 %	23,5
Brij 35, 0,05 %	24,5
<i>Substances tensioactives cationiques</i>	
Zéphirol 50, 0,05 %	21,5
Cétavlon, 0,05 %	23
Br. de L., 0,05 %	17,5
<i>Substances tensioactives anioniques</i>	
DSNa, 0,05 %	2
DSNa, 0,05 % + NaCl 0,5 M	12
EDSNa, 0,05 %	1
EDSNa, 0,05 % + NaCl 0,5 M	22
EDSNa, 0,5 %	0
EDSNa, 0,5 % + NaCl 0,5 M	10
<i>Substances tensioactives naturelles</i>	
Saponine, 0,1 %	20
TCNa, 0,05 %	2
TCNa, 0,05 % + NaCl 0,5 M	21

*Hydrolyse à 37° de l'hippuryl-DL-phénylalanine et de la carbobenzoxyglycyl-L-leucine en présence soit de Tween 80, soit de chlorure de sodium.* Le Tableau II indique également les valeurs de  $K_M$  et de  $k_3$  correspondant à l'hydrolyse de l'hippuryl-DL-phénylalanine et à celle de la carbobenzoxyglycyl-L-leucine à 37° en présence de Tween ou de NaCl.

*B. Influence de quelques substances tensioactives comparée à celle du Tween 80*

On a vu antérieurement (*cf.* Fig. 1) l'influence du Tween 80 à différentes concentrations sur l'hydrolyse de l'hippuryl-DL-phénylalanine. Il était intéressant d'étudier l'influence éventuelle d'autres substances tensioactives. Les expériences sont faites ici, à 25°, en mettant en jeu 0.1 µg d'enzyme par ml de milieu réactionnel, et en utilisant comme substrat l'hippuryl-DL-phénylalanine  $4 \cdot 10^{-2} M$ . Le Tableau IV indique la nature des substances étudiées, les détails expérimentaux et les résultats obtenus.

#### DISCUSSION

L'ensemble des résultats obtenus, concernant les constantes cinétiques et thermodynamiques en présence de Tween et de chlorure de sodium, présenté dans le Tableau II montre que: (1) quel que soit le substrat et quelle que soit la température, la constante de Michaelis est trois fois plus faible en présence de Tween 80 qu'en présence de chlorure de sodium, l'une et l'autre de ces substances étant à la concentration donnant un effet maximum. (2) Quoique les valeurs de  $k_3$  en présence de chlorure de sodium soient quelque peu sujettes à caution, on peut considérer qu'à une même température  $k_3$  en présence de Tween est très voisin de  $k_3$  en présence de chlorure de sodium; la différence que l'on observe dans le cas de l'hydrolyse de la carbobenzoxyglycyl-L-phénylalanine est vraisemblablement due à l'imprécision de la mesure de la concentration de *e actif* en faible concentration d'enzyme; dans le cas de l'hydrolyse de la carbobenzoxyglycyl-L-leucine, où les quantités d'enzyme en jeu sont environ dix fois plus grandes et où, par conséquent l'inactivation par dilution est en effet beaucoup moins importante, cette différence n'existe pas. (3) Dans le cas de l'hydrolyse de la carbobenzoxyglycyl-L-phénylalanine, les constantes thermodynamiques de l'activation du complexe enzyme-substrat, conduisant à la décomposition de ce complexe sont très voisines en présence de Tween et en présence de chlorure de sodium.

Il apparaît donc que le premier stade du processus enzymatique, à savoir la formation du complexe enzyme-substrat est seul modifié par la présence de Tween ou de sel, le second stade présentant la même constante de vitesse et les mêmes constantes thermodynamiques, quelles que soient les conditions d'hydrolyse. Il y a là un argument en faveur de l'hypothèse selon laquelle le Tween ou les sels agiraient en modifiant l'enzyme dont l'affinité pour ces substrats serait ainsi accrue ou diminuée. Une telle hypothèse est indépendante de l'interprétation physique que l'on donne de la constante de Michaelis<sup>7, 15, 17, 18</sup>, que cette constante soit égale à  $k_2 + k_3/k_1$ , ou qu'elle tende vers  $k_2/k_1$  ou vers  $k_3/k_1$ ; cette dernière interprétation est celle que LUMRY ET SMITH<sup>1</sup> ont proposée dans le cas de la carboxypeptidase. D'autre part, les résultats précédents permettent de rejeter définitivement l'hypothèse<sup>5</sup> que les activateurs en question exercent leur action en protégeant la carboxypeptidase contre une

dénaturation au cours de son action enzymatique. Il a paru utile de reproduire dans le Tableau V à titre de comparaison, les valeurs des constantes cinétiques et thermodynamiques pour l'hydrolyse de la carbobenzoxyglycyl-L-phénylalanine, telles qu'elles ont été déterminées par d'autres auteurs<sup>3, 19</sup>. On peut remarquer en comparant les Tableaux II et V que les valeurs obtenues en tampon véronal en présence de KCl 0.5 M par LUMRY ET SMITH sont très voisines de celles obtenues ici en présence de NaCl 0.5 M. Par contre, ces deux groupes de valeurs diffèrent sensiblement de celles mesurées en tampon phosphate en présence de LiCl 0.1 M par SNOKE ET NEURATH.

TABLEAU V

CONSTANTES CINÉTIQUES ET THERMODYNAMIQUES LIÉES À L'HYDROLYSE DE LA CARBOBENZOXYGLYCYL-L-PHÉNYLALANINE PAR LA CARBOXYPEPTIDASE, SELON LUMRY ET SMITH<sup>3</sup>, SELON SNOKE ET NEURATH<sup>19</sup>

Constantes à 25°	Solution tampon véronal 0.035 M pH 7.5, KCl 0.5 M (LUMRY ET SMITH)	Solution tampon phosphate 0.04 M pH 7.5, LiCl 0.1 M (SNOKE ET NEURATH)
$k_3$ (sec <sup>-1</sup> )	189	186
$K_M$ (mol./l)	$1.3 \cdot 10^{-2}$	$3.3 \cdot 10^{-2}$
$\Delta H^*$ (cal./mol.)	8,900	14,500
$\Delta F^*$ (cal./mol.)	15,800	15,600
$\Delta S^*$ (cal./mol./degré)	— 23	+ 36

En ce qui concerne l'action des substances tensioactives autres que le Tween 80, il apparaît que: (1) les substances cationiques et les substances non-ioniques exercent une action comparable à celle du Tween 80 à la concentration de 0.05 %. (2) Les substances anioniques, par contre, non seulement n'augmentent pas l'activité de la carboxypeptidase mais même la diminuent, lorsque cette activité est mesurée dans les conditions optima, par exemple en présence de sel. (Leur action à des concentrations supérieures à 0.5 % n'a pu être examinée dans nos conditions de travail pour des raisons d'insolubilité.)

## RÉSUMÉ

L'étude cinétique de l'hydrolyse par la carboxypeptidase de quelques uns de ses substrats, en présence soit de Tween 80, soit de chlorure de sodium, a montré qu'entre 25° et 37° la constante de Michaelis est trois fois plus faible en présence de Tween qu'en présence de sel, et ceci quel que soit le substrat. Par contre, à une même température, les constantes de vitesse de décomposition du complexe enzyme-substrat, ainsi que les constantes thermodynamiques de l'activation de ce complexe sont très voisines quelles que soient les conditions.

L'étude de l'influence de substances tensioactives autres que le Tween 80, a montré que les groupes de substances tensioactives non ioniques et cationiques sont pourvues de la propriété d'accroître l'activité enzymatique de la carboxypeptidase et que seul le groupe des substances tensioactives anioniques est dépourvu de cette propriété.

## SUMMARY

The study of the kinetics of the hydrolysis by carboxypeptidase of some of its substrates in the presence of either Tween 80 or NaCl has shown that between 25 and 37° the Michaelis constant is 3 times as weak in the presence of Tween as in the presence of salt, irrespective of which of the substrates is used. On the other hand, at the same temperature the decomposition-rate constants

of the enzyme-substrate complex, as well as the thermodynamic constants of its activation are very close to each other, under all conditions.

A study of the effect of surface-active substances other than Tween 80 has shown that groups of non-ionic and cationic surface-active substances are capable of augmenting the enzymic activity of carboxypeptidase, and that only the group of anionic surface-active substances is without this property.

#### BIBLIOGRAPHIE

- 1 R. LUMRY, E. L. SMITH ET R. GLANTZ, *J. Am. Chem. Soc.*, 73 (1951) 4330.
- 2 L. GORINI ET J. LABOUESSE-MERCOUROFF, *Biochim. Biophys. Acta*, 13 (1954) 291.
- 3 R. LUMRY ET E. L. SMITH, *Discussions Faraday Soc.*, 20 (1955) 105.
- 4 S. YANARI ET M. A. MITZ, *J. Am. Chem. Soc.*, 79 (1957) 1154.
- 5 J. LABOUESSE, *Biochim. Biophys. Acta*, 26 (1957) 52.
- 6 E. L. SMITH ET A. STOCKELL, *J. Biol. Chem.*, 207 (1954) 501.
- 7 N. M. GREEN ET H. NEURATH, dans H. NEURATH ET K. BAILEY, *The Proteins*, Vol. II, part B, Academic Press, Inc., New-York, 1954, p. 1057.
- 8 E. FISCHER ET W. SCHOELLER, *Ann.*, 357 (1907) 1.
- 9 K. HOFMANN ET M. BERGMANN, *J. Biol. Chem.*, 134 (1940) 225.
- 10 E. FISCHER ET O. WARBURG, *Ann.*, 340 (1905) 123.
- 11 M. A. STAHHANN, J. S. FRUTON ET M. BERGMANN, *J. Biol. Chem.*, 164 (1946) 753.
- 12 T. CURTIUS ET E. MULLER, *J. prakt. Chem.*, (2), 70 (1904) 223.
- 13 S. MOORE ET W. H. STEIN, *J. Biol. Chem.*, 176 (1948) 367.
- 14 G. S. EADIE, *J. Biol. Chem.*, 146 (1942) 85.
- 15 H. NEURATH ET G. W. SCHWERT, *Chem. Revs.*, 46 (1950) 69.
- 16 A. E. STEARN, *Advances in Enzymol.*, 9 (1949) 25.
- 17 H. LINDLEY, *Advances in Enzymol.*, 15 (1954) 271.
- 18 K. J. LAIDLER, *Discussions Faraday Soc.*, 20 (1955) 83.
- 19 J. E. SNOKE ET H. NEURATH, *J. Biol. Chem.*, 181 (1949) 789.

Reçu le 2 Septembre 1957

#### ADENOSINE MONO-, DI- AND TRIPHOSPHATE, PYRUVIC KINASE, HEXOKINASE AND POLYNUCLEOTIDE PHOSPHORYLASE ASSAY\*

SANTIAGO GRISOLIA\*\*, LEWIS C. MOKRASCH AND VERNE D. HOSPELHORN  
*McIlvain Laboratories and Lerrigo Laboratories, Department of Mecidine, University of Kansas Medical Center, Kansas City, Kansas (U.S.A.)*

The procedures described here provide fast, simple, reproducible and reasonably specific assays for adenylic acid, AMP\*\*\*, ADP and ATP as well as for the assay of pyruvic kinase, hexokinase and polynucleotide phosphorylase. All procedures are based on the interdependence of the components of reactions:

\* Supported by Grants No. 67 The Helen Hay Whitney Foundation, H 1925 National Institutes of Health, Life Insurance Medical Research Fund and the Kansas Heart Association.

\*\* Established Investigator of the American Heart Association.

\*\*\* The following abbreviations are used in this paper: AMP, ADP, ATP, 5'-adenosine mono-, di-, or triphosphate respectively; PGA, 3-D-phosphoglyceric acid; 2-PGA, 2-D-phosphoglyceric acid; PEP, phosphoenol pyruvic acid; mutase, 3-phosphoglyceric acid mutase; 2,3-DPGA, 2,3-diphosphoglyceric acid. RNA, ribose nucleic acid; Tris, tris (hydroxymethyl)-aminomethane; AMPCO<sub>2</sub>, the active intermediate described by BACHHAWAT *et al.*<sup>16</sup>.